

## ⑫ 特 許 公 報 (B2) 昭56-12438

⑮ Int.Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

②④公告 昭和56年(1981)3月20日

C 12 P 19/32  
C 12 P 19/32  
C 12 R 1/125

7115-4B

発明の数 1

(全3頁)

1

## ⑮グアノシン-5'-モノリン酸の製造法

①特 願 昭52-84393

②出 願 昭52(1977)7月14日

公 開 昭54-20195

③昭54(1979)2月15日

⑦発 明 者 佐藤勝明

横須賀市馬堀海岸1-1

⑦発 明 者 松井裕

川崎市幸区鹿島田958

⑦発 明 者 江井仁

逗子市池子2丁目30-2

⑦発 明 者 滝波弘一

横浜市港北区篠原台町3-16-310

⑦出 願 人 味の素株式会社

東京都中央区京橋一丁目5番8号

## ⑮特許請求の範囲

1 アデニン要求性を有しさらにデコイニンまたはメチオニンスルフォキシドに耐性を有し、かつグアノシン-5'-モノリン酸生産能を有するバチルス属の変異株を培養し、培地中に生成蓄積したグアノシン-5'-モノリン酸を採取することを特徴とするグアノシン-5'-モノリン酸の製造法。

## 発明の詳細な説明

この発明はグアノシン-5'-モノリン酸(以下GMPと記す)の製造法に関する。

GMPは調味料として使用されていて、バチルス属のアデニン要求性変異株が培地中に生成することが知られている。

本発明者らはこのようなGMPの効率のよい製造法を見出すべく研究した結果、アデニン要求性を有しさらにデコイニンまたはメチオニンスルフォキシドに耐性を有するバチルス属の変異株の中から著量のGMPを培地中に生成蓄積する能力を有する変異株を見出した。この発明はこの知見に基づいて完成されたものである。

2

本発明の方法において用いる変異株は、上記のような、バチルス属の微生物より人工的に変異誘導したアデニン要求性を有し、デコイニンまたはメチオニンスルフォキシドに耐性を有する変異株である。

このうちヌクレオチダーゼ活性が低下した変異株よりさらにGMPの収率が高い菌株が得られる場合が多い。

具体的には次の変異株がある。

10 バチルス・ズブチリス AJ 11160 (FERM-P 4122) (アデニン要求、デコイニン耐性)

バチルス・ズブチリス AJ 11161 (FERM-P 4123) (アデニン要求、デコイニン耐性、メチオニンスルフォキシド耐性)

15 このような変異株を誘導する方法はN-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等で処理する等の通常の方法でよい。変異処理した菌株より本発明の薬剤耐性株を分離する方法は、当該薬剤を親株が生育しえないような量を含有する培地に生育しうるような菌株を選択すればよい。

具体的にはこれらの変異株は以下の方法で採取した。

25 バチルス・ズブチリス (IAM-1523) よりアデニン要求性を有するAJ 11159 (FERM-P 4121)を誘導した。これよりさらにN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンで(1000 $\mu$ /cc, 0℃)、5分間処理し、下記の基本培地にデコイニン1000 $\mu$ /mlを添加したプレートに塗布し、2~10日間34℃で培養して、出現したコロニーの中からAJ 11160を選別した。

## &lt;基本培地&gt;

グルコース	2	g/dl
塩化アンモン	0.5	g/dl
磷酸第1カリ	0.4	g/dl
硫酸マグネシウム	0.02	g/dl

3

4

クエン酸ソーダ 0.05 g/dℓ  
 L-グルタミン酸 0.1 g/dℓ  
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mg/dℓ  
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1 mg/dℓ  
 アデニン 10 mg/dℓ  
 pH (KOH) 7.5

寒天 2.0 g/dℓ

AJ 11159とAJ 11160のデコイニンに対する生育度を第1表に記す。

第1表 デコイニンに対する生育度

デコイニン	菌株	AJ 11159	AJ 11160
0 r/ml		100%	100%
100		60	100
1000		0	100
2000		0	100

実験方法は、前記の基本培地（寒天は除く）にデコイニンを100、1000または2000 r/mlを添加した液体培地3 mlを入れた小型試験管にAJ 11159またはAJ 11160を約 $10^6 \sim 10^7$ 個接種し、34℃にて振盪培養した。24時間後の生育を測定し、デコイニン無添加区との相対比で表示した（第1表）

次にAJ 11160を更にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン1000 r/ℓで、0℃、50分処理して、上記の基本培地に500 r/mlのメチオニンスルフォキシドを添加したプレートに塗布し4日間34℃で培養して出現したコロニーを採取し、その内よりAJ 11161を選別した。AJ 11160とAJ 11161のメチオニンスルフォキシドに対する生育度を第2表に記す。

\* 2表に記す。

第2表 メチオニンスルフォキシドに対する生育度

メチオニンスルフォキシド	菌株	AJ 11160	AJ 11161
0		100	100
100		30	100
500		0	100
1000		0	50

実験方法は前述のデコイニンにおける場合と同様の方法に従った。

このような変異株を培養する方法は通常の炭素源、窒素源、無機イオン、さらに必要な場合にはその他の有機微量栄養素を含有する通常の培地である。もちろんアデニン要求性を満足すべきアデニン等の物質が添加される。炭素源としてはグルコース等の炭水化物が最も望ましい。窒素源としてはアンモニウム塩、アンモニアガス、アンモニア水等が使用できる。無機イオンとしてはマグネシウムイオン、カリイオン、磷酸イオン等が適宜使用される。さらに必要によりビタミン、アミノ酸等の有機微量栄養素を適宜添加する。

培養は好気的条件下に、望ましくはpH 4ないし7.5、温度は28ないし37℃の範囲に制御しつつ行くとよりよい結果が得られる。かくして1ないし4日間も培養を行えば培地中に蓄量のGMPが蓄積される。

培養液からGMPを採取する方法は、イオン交換樹脂を用いる等の通常の方法でよい。

実施例 1

第3表

シード培地	主発酵培地
グルコース 2.0 g/dℓ	グルコース 8 g/dℓ
酵母エキス 0.5 "	$\text{NH}_4\text{NO}_3$ 1.5 "
食塩 0.1 "	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1 "
アデニン 0.02	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 "
大豆蛋白加水分解液 4 ml/dℓ	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/dℓ
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1 g/dℓ	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 "
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 "	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/dℓ
pH 7.5 (KOH)	アデニン 0.02 "
115℃、10分殺菌	大豆蛋白加水分解液 4 ml/dℓ
	pH 6.5 (KOH)
	115℃、10分殺菌

5

第3表に示すシード培地50mlを入れた500ml容フラスコに第4表に示す菌株を1白金耳ずつ接種し、34℃にて16時間培養した。この培養液を、第3表に示す主発酵培地20mlを入れた500ml容フラスコに1ml添加して34℃にて72時間培養した。この培養液中のGMPを高速液体クロマトグラフィーにて定量したところ、第4表に示す量のGMPが生成蓄積した。

6

AJ 11161の培養液1.0ℓより菌体を濾過分離し、濾液を塩酸でpH 1.5にし、「ダイアイオンSK#1」(H型)の樹脂塔に通した。ついで、蒸留水を流し、濾液に続いて流出される水洗初期の流出液のGMPを含む分画を集め、水酸化ナトリウムでpH 7.2に調節した。

これを減圧濃縮后、冷却してGMP, 2Na·7.5H<sub>2</sub>Oの結晶10gを得た。

第 4 表

菌 株			GMP ( GMP · 2Na · 7.5H <sub>2</sub> Oとして )
パチルス・ズブチリス	AJ	11159	0.2
"	"	AJ 11160	2.0
"	"	AJ 11161	2.5